

103

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1892

THÈSE

N

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Mercredi 24 février 1892, à 1 heure

PAR

L. BOUVEAULT

Né à Nevers le 11 février 1864.

Ancien élève de l'Ecole Polytechnique,
Docteur ès-sciences physiques,
Préparateur à la Faculté de Médecine.

ÉTUDES CHIMIQUES

DE LA

BACILLE DE LA TUBERCULOSE AVIAIRE

Président : M. GAUTIER, professeur.

Juges : { MM.
PINARD, professeur,
A. ROBIN, FAUCONNIER, agrégés.

*Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diversis
parties de l'enseignement médical.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
HENRI JOUVE

15, rue Racine, 15

1892

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1892

THÈSE

N

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Mercredi 24 février 1892, à 1 heure

PAR

L. BOUVEAULT

Né à Nevers le 11 février 1864.

Ancien élève de l'Ecole Polytechnique,
Docteur ès-sciences physiques,
Préparateur à la Faculté de Médecine.

ÉTUDES CHIMIQUES

DE LA

BACILLE DE LA TUBERCULOSE AVIAIRE

Président : M. GAUTIER, professeur.

Juges : $\left\{ \begin{array}{l} \text{MM.} \\ \text{PINARD, professeur,} \\ \text{A. ROBIN, FAUCONNIER, agrégés.} \end{array} \right.$

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
HENRI JOUVE

15, rue Racine, 15

1892

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen	M. BROUARDEL
Professeurs	MM.
Anatomie.....	FARABEUF.
Physiologie.....	CH. RICHT.
Physique médicale.....	GARIEL.
Chimie organique et chimie minérale.....	A. GAUTIER.
Histoire naturelle médicale.....	BAILLON.
Pathologie et thérapeutique générales.....	BOUCHARD.
Pathologie médicale.....	DIEULAFOY.
Pathologie chirurgicale.....	DEBOVE
Anatomie pathologique.....	LANNELONGUE.
Histologie.....	CORNIL.
Opérations et appareils.....	MATHIAS DUVAL.
Pharmacologie.....	TILLAX.
Thérapeutique et matière médicale.....	REGNAULD.
Hygiène.....	HAYEM.
Médecine légale.....	PROUST.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	BROUARDEL.
Pathologie comparée et expérimentale.....	LABOULBENE.
	STRAUS
	G. SEE.
Clinique médicale.....	POTAIN.
	JACCOUD.
	PETER.
	GRANCHER.
Clinique des maladies des enfants.....	BALL.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale.....	FOURNIER.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	CHARCOT.
Clinique des maladies du système nerveux.....	VERNEUIL.
Clinique chirurgicale.....	LE FORT.
	DUPLAY
	LE DENTU.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	GUYON.
Clinique ophthalmologique.....	PANAS.
Cliniques d'accouchements.....	TARNIER.
	PINARD

Professeurs honoraires : MM. SAPPEY, HARDY et PAJOT.

Agrégés en exercice.

MM.	MM.	MM.	MM.
BALLET.	GILBERT.	NETTER.	ROBIN Albert.
BAR.	GLEY.	POIRIER, chef des	SCHWARTZ.
BLANCHARD.	HANOT.	travaux anatomiques	SEGOND.
BRISSAUD.	HUTINEL.	POUCHET.	TROISIER.
BRUN.	JALAGUIER.	QUENU.	TUFFIER.
CAMPENON.	KIRMISSON.	QUINQUAUD.	VILLEJEAN.
CHANTEMESSE	LETULLE.	RETTÉTER.	WEISS.
CHAUFFARD.	MARIE.	REYNIER.	
DEJERINE.	MAYGRIER.	RIBEMONT-DESSAIGNES	
FAUCONNIER.	NELATON.	RICARD.	

Le secrétaire de la Faculté ; CH. PUPIN.

Par délibération en date du 9 déc. 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans ses dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A M. LE PROFESSEUR CHARLES RICHEL.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MON PÈRE BIEN-AIMÉ.

ÉTUDES CHIMIQUES

SUR LE

BACILLE DE LA TUBERCULOSE AVIAIRE

INTRODUCTION

L'étude des toxines élaborées par les différents microbes est devenue un des chapitres les plus importants de la chimie biologique. Cette recherche est, en général, rendue très difficile par l'extrême complexité des milieux dans lesquels la culture a été opérée. Les méthodes de la bactériologie n'ont pas été créées en vue de l'étude chimique ultérieure des bouillons de culture et cela est fort fâcheux, car il est probable qu'avec quelques efforts les bactériologistes seraient arrivés à cultiver les différents microbes dans des milieux de composition connue, ce qui aurait permis aux chimistes d'avoir pour leur travail un point de départ solide.

Cette nécessité a été fort bien comprise par M. Raulin, d'abord, et ensuite par MM. Charrin et Arnaud, qui ont

cultivé sur un bouillon artificiel le bacille du pus bleu. Malheureusement, les cultures n'ont pu être faites en assez grande quantité pour que l'étude de la toxine ait pu être complètement achevée (*Comptes-Rendus*, t. 112, p. 755 et 1157). Néanmoins, la voie est maintenant indiquée et il est à espérer que les bactériologistes voudront bien porter leurs efforts de ce côté.

MM. Richet et Héricourt ont opéré pendant les mois d'août et de septembre dernier une culture en grand du bacille de la tuberculose aviaire et ont bien voulu me prier d'examiner, au point de vue chimique, les bouillons ainsi obtenus. Cette culture ayant été faite sur du bouillon de veau, j'ai été obligé de me livrer, au préalable à l'analyse de ce liquide. Je publie la méthode que j'ai employée et les résultats que j'ai obtenus, dans l'espoir d'être utile aux chimistes qui auraient à étudier des cultures développées sur un milieu analogue.

Au début de cet exposé, je m'empresse d'adresser mes bien sincères remerciements à M. le professeur Charles Richet, dans le laboratoire duquel j'ai opéré, des matériaux qu'il a bien voulu mettre à ma disposition et de ses bienveillants conseils.

PRÉPARATION DU BOUILLON DE CULTURE

Le milieu dans lequel a été cultivé le bacille de la tuberculose aviaire consiste essentiellement en bouillon de viande de veau, additionné de diverses substances nutritives. Ce bouillon a été préparé de la manière suivante : pour en faire un litre, on met un kilogramme de viande de veau, soigneusement dégraissée et coupée en menus morceaux, dans une marmite contenant un litre et demi d'eau. On porte à l'ébullition pendant 4 à 5 heures, jusqu'à ce que le liquide soit réduit à un litre environ ; on filtre alors le liquide chaud sur un filtre mouillé, qui retient la petite quantité de graisse restée adhérente à la fibre musculaire. Le liquide encore chaud est alors additionné de :

Peptone	12 gr.
Sucre	20 gr.
Glycérine	60 gr.

On ajoute ensuite une solution concentrée de carbonate de sodium dans le liquide chauffé au bain-marie, jusqu'à ce que l'on obtienne une réaction légèrement alcaline au tournesol. On abandonne ensuite le tout au bain-marie pendant 2 à 3 heures. On complète exactement le volume à un litre, puis on filtre chaud. On se débarrasse ainsi des phosphates de chaux et de magnésie qui existent en

petite quantité dans la viande. Le bouillon ainsi obtenu, puis stérilisé dans l'autoclave à 120° , reste parfaitement limpide, il est coloré en brun; refroidi de 10° à 15° , il forme une gelée assez peu résistante.

Afin de pouvoir déterminer quelles sont les transformations produites par le bacille dans son milieu de culture, il était nécessaire d'en connaître parfaitement la composition chimique, j'ai donc été conduit à faire l'analyse immédiate du bouillon de veau.

ANALYSE DU BOUILLON DE VEAU

Historique. — Il n'existe pas de méthode permettant d'opérer l'analyse d'un mélange aussi compliqué que le bouillon d'une viande quelconque. Dans un travail célèbre (*Annalen der Chemie und Pharmacie*, t. 62, p. 278 et *Annales de Chimie et de Physique*, 3^e série, t. 23, p. 129), Liebig a fait faire à la question un pas immense. Il a étudié les jus de viande obtenus à froid par pression, et les bouillons obtenus par ébullition. Les matières extractives ont, dans les deux cas le plus grand rapport, mais elles diffèrent cependant, par ce fait que les premières contiennent des albumines coagulables par la chaleur qui font défaut dans les secondes ; d'un autre côté, l'extrait fait à froid contient une très faible quantité de gélatine, tandis que les bouillons et surtout celui de veau en contiennent abondamment.

Quant aux matières communes aux extraits faits à froid et aux bouillons, Liebig reconnut qu'elles consistaient en sels minéraux dont il fit une analyse très complète (principalement chlorure et phosphate de potassium et phosphate de magnésie) et en matières organiques qu'il déterminait incomplètement. Il put extraire du mélange, de la créatine, de la créatinine et un acide nouveau qu'il appela l'acide inosique. Enfin, il isola aussi l'acide sarco-

lactique qui avait déjà été obtenu par Berzélius en 1807, mais il eut le mérite de voir que cet acide était différent de l'acide lactique ordinaire, ce dont Berzélius ne s'était pas aperçu.

Cette question de l'acide sarcolactique fut reprise par Strecker (*Annalen der Chemie und Pharmacie*, t. 105, p. 363 et t. 113, p. 354), mais elle ne fut définitivement élucidée que par le grand travail de Wislicenus (*Annalen*, t. 164, p. 181 et t. 161, p. 302). Ce savant fit voir que l'acide sarcolactique était un mélange d'acide éthylénolactique $\text{CH}^2\text{OH}—\text{CH}^2—\text{CO}^2\text{H}$ et d'un acide, isomère physique de l'acide lactique ordinaire $\text{CH}^3—\text{CHOH}—\text{CO}^2\text{H}$, mais possédant le pouvoir rotatoire dont ce dernier est dépourvu; il appela cet acide l'acide paralactique. Il eût mieux valu donner à l'acide lactique de fermentation ce nom de paralactique et appeler le nouvel acide acide lactique gauche, ce qui eût respecté l'analogie entre les deux acides et l'acide racémique ou paratartrique d'une part, et l'acide tartrique gauche de l'autre.

M. Wislicenus remarqua, de plus, que l'extrait de viande commercial contenait une faible quantité d'acide éthylénolactique (β oxypropionique), tandis que le bouillon fait avec les viandes de boucherie en contenait une portion bien moins notable.

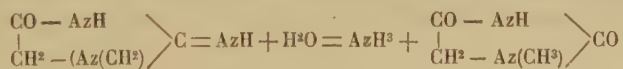
Le travail de Liebig fut continué par Strecker et Scherer. Le premier découvrit la sarcine dans le sérum musculaire (*Annalen*, t. 102, p. 294 et t. 108, p. 129; *Ann. de Phys. et de Chim.*, 3^e série, t. 55, p. 338 et 345); le second y trouva la xanthine (*Annalen*, t. 102, p. 204 et

t. 112, p. 257; *Répert. Chim. pure*, 1859, p. 120 et 1860, p. 146). Leurs procédés d'extraction et de séparation de ces deux bases furent perfectionnés par Staedeler (*Annalen*, t. 116, p. 102, et *Rép. Chim. pure*, 1861, p. 160), et surtout par Neubauer. Ce savant a fourni une méthode qui permet de séparer des substances qui les accompagnent dans le bouillon, la sarcine et la xanthine, à l'état de combinaisons argentiques. Le mélange est ensuite traité à l'ébullition par de l'acide nitrique de densité 1,1 qui les dissout; mais, par refroidissement, la combinaison avec la sarcine cristallise, tandis que le composé xanthique reste en solution; on peut l'obtenir en précipitant par l'ammoniaque. On peut ainsi doser assez facilement dans le bouillon la xanthine et la sarcine.

Dès 1850, Scherer avait trouvé dans le bouillon une matière sucrée, l'inosite (*Annalen*, t. 73, p. 322); il l'extrayait des eaux-mères qui avaient laissé déposer la créatine.

De plus, certains auteurs avaient signalé dans le bouillon la présence de petites quantités de glucose, d'acide urique et d'urée.

En 1883, MM. Guareschi et Mosso (*Annales italiennes de biologie*) annoncèrent avoir extrait de la méthylhydantoïne de la chair de veau; mais on sait que cette uréide prend aisément naissance par l'action des hydratants sur la créatinine; il ne serait pas étonnant que la méthylhydantoïne obtenue par les savants italiens provînt de l'action sur la créatinine des réactifs qu'il ont employés.



Enfin, est venu l'important travail de M. Armand Gautier sur les ptomaïnes (*Ptomaïnes et leucomaïnes*, Masson, Paris, 1886). M. Gautier a fait voir que l'extrait fait à froid de viande de bœuf fraîche, de même que l'extrait de viande américain, contiennent, outre les bases déjà indiquées, un certain nombre d'alcaloïdes nouveaux se rattachant aux familles de la créatine, de la créatinine et de la xanthine, à savoir :

la xanthocréatinine $C^3H^{10}Az^4O$

la chrusocréatinine $C^3H^8Az^4O$

qui sont voisines de la créatinine,

l'amphicréatine $C^9H^{19}Az^7O^4$

la base $C^{11}H^{24}Az^{10}O^5$

la base $C^{12}H^{25}Az^{11}O^5$

qui se rapprochent de la xanthine,

et la pseudoxanthine $C^4H^5Az^2O$

qui possède des propriétés analogues à celles de la xanthine et de la sarcine.

Enfin, M. Weidel a retiré de l'extrait de viande américain (*Annalen*, t. 168, p. 353 et *Bull. Soc. chim.*, t. 16, p. 173), une base qu'il a nommée la carnine et qui a pour formule $C^7H^8Az^4O^3$; mais cette base n'a pas été trouvée dans l'extrait de viande fraîche.

La question en était là quand j'ai été conduit à rechercher les substances qui existaient dans le bouillon de veau. Je savais donc qu'il pouvait exister dans ce bouillon un très grand nombre de substances organiques et je connaissais les méthodes employées par les auteurs pour les obtenir. Il fallait trouver une méthode de traitement

permettant d'appliquer les nombreuses méthodes particulières employées pour la séparation de ces nombreux composés et n'empêchant pas de reconnaître les composés nouveaux qui pourraient également y exister sans avoir jamais été décrits. Je ne me flatte pas d'avoir résolu complètement un problème d'analyse immédiate aussi difficile, je crois cependant que la méthode que je vais décrire peut être un instrument précieux. Elle m'a permis de séparer la matière première en un assez grand nombre de fractions, dont quelques-unes ont été complètement élucidées, et dont quelques autres n'ont encore pu l'être faute de temps. J'espère aboutir un jour au résultat d'autant plus que les réactifs employés pour la séparation des diverses fractions me sont garants qu'elles n'ont pas été profondément altérées.

Mode opératoire. — Nous avons préparé le bouillon comme nous l'avons indiqué plus haut, de manière que un litre corresponde à un kilogramme de viande dégraissée. Froid, ce bouillon est solide à cause de la grande quantité de gélatine qu'il contient ; il est en même temps assez fortement acide. On le sature à la température du bain-marie par de l'hydrate de baryum cristallisé, jusqu'à ce que sa réaction soit devenue faiblement alcaline. Il se forme aussitôt un assez abondant précipité blanc qui se dépose assez rapidement ; on ajoute ensuite quelques gouttes de chlorure de baryum tant qu'il se fait un précipité, puis on filtre chaud sur un filtre mouillé au préalable. Le bouillon filtré est parfaitement limpide et complètement débarrassé de graisse. Le filtre a retenu les

sulfates et phosphates précipités à l'état de sels barytiques, les phosphates de magnésie et de chaux à l'état de sels tribasiques. Ces divers sels ayant été parfaitement dosés par Liebig, je les ai rejetés sans m'en préoccuper davantage.

Le bouillon est ensuite distillé dans le vide à une température de 40 à 50° ; je crois utile à ce propos d'entrer dans le détail de l'appareil dans lequel j'ai réalisé cette distillation.

Cet appareil se composait d'un ballon de quatre litres en communication avec un réfrigérant Liebig dont le tube intérieur était en plomb et possédait environ 10 millimètres de diamètre. Ce réfrigérant était lui-même en communication avec un serpentín formé d'un tube de plomb identique à celui du réfrigérant et ayant de longueur 1 m. 80 ou 2 m. Ce serpentín était contenu dans un bocal de verre portant une tubulure à la partie inférieure et d'une contenance qui ne dépassait pas deux litres. Le serpentín était en relation avec un ballon de deux litres à deux tubulures, en relation lui-même avec une trompe à eau. Cet appareil convenablement monté tient aisément dans un demi-mètre carré ; néanmoins, à cause de la grande longueur des réfrigérants et de la bonne conductibilité du plomb, il permet de distiller de un litre et demi à deux litres d'eau en une heure. On sait combien sont longues en général les évaporations dans le vide des liqueurs aqueuses, à cause de la très grande chaleur spécifique de volatilisation de l'eau ; cet inconvénient est totalement supprimé par l'emploi du réfrigérant en plomb.

J'ai fait chaque opération sur dix litres de bouillon que je concentrais à deux litres ; on ne peut pas aller plus loin aisément à cause de l'énorme quantité de gélatine contenue dans ce bouillon. De plus, afin d'éviter le brunissement de la masse, j'ai renoncé à alimenter mon ballon d'une manière continue. Ce procédé a, en effet, l'inconvénient de chauffer pendant plus longtemps qu'il n'est nécessaire les portions déjà concentrées. J'ai préféré introduire à chaque opération deux litres et demi de bouillon dans le ballon et distiller jusqu'à ce que j'arrive à trois quarts de litre environ. Je vidais alors complètement le ballon et je le remplissais à nouveau avec deux litres et demi de bouillon. Après quatre opérations de ce genre, qui duraient environ une heure chacune, je versais dans le ballon les trois litres de bouillon concentré et j'évaporais tant que l'ébullition n'était pas trop tumultueuse, c'est-à-dire à deux litres ou un peu moins.

Ces diverses distillations ne se sont d'ailleurs pas faites sans quelques difficultés, à cause de la mousse. En effet, mon bouillon est alcalin et très chargé en matières albuminoïdes, aussi moussait-il au point de rendre la distillation dans le vide impossible. Or, je ne voulais pas distiller dans un ballon presque vide, avec alimentation continue, pour les raisons que j'ai déjà exposées. Je suis arrivé à supprimer complètement la mousse en ajoutant environ un gramme d'huile de lin par litre de bouillon. L'ébullition se fait alors très régulièrement ; mais l'emploi de l'huile n'est pas sans quelques inconvénients dont je parlerai plus loin. Depuis l'époque où ce travail a été

fait, j'ai eu occasion de me servi, d'un autre brise-mousse que j'ai trouvé bien préférable; il consiste simplement en larges lames de liège que l'on introduit dans le ballon distillatoire; l'ébullition en leur présence cesse d'être tumultueuse.

Pour résumer, la distillation dans le vide a séparé les dix litres de bouillon d'où j'étais parti en deux litres d'extrait concentré A et huit litres d'un liquide B.

Ce liquide possède une odeur assez agréable, mais ne rappelant nullement celle du bouillon, il est louche, comme s'il contenait en suspension une faible quantité de matière huileuse et possède une réaction nettement alcaline. Ce liquide précipite le réactif de Nessler en brun verdâtre, j'ai recueilli le précipité correspondant à huit litres de ce liquide; je l'ai lavé soigneusement à l'eau et décomposé par l'hydrogène sulfuré en présence d'acide chlorhydrique.

Après filtration du sulfure de mercure la liqueur a été évaporée au bain-marie; il est resté un résidu très faible presque uniquement constitué par de l'iodoforme. Je me suis proposé d'étudier les matières alcalines contenues dans le liquide distillé et j'indiquerai plus loin quel traitement je lui ai fait subir.

Traitement de l'extrait A. — L'extrait A qui est absolument solide à froid est fondu au bain-marie; quand il est environ à 80°, on y ajoute par petites portions et en agitant à chaque fois, le double de son volume d'alcool à 80°, puis on abandonne le tout pendant quelques heures. Au bout de ce laps de temps, il s'est formé au fond du

ballon une masse spongieuse C très abondante qui constitue la presque totalité de la gélatine contenue dans le bouillon; le liquide qui surnage D est parfaitement limpide, on les sépare l'un de l'autre par simple décantation.

La masse spongieuse C se redissout dans l'eau chaude très aisément, mais elle se dissout très lentement dans l'eau froide; elle consiste presque exclusivement en gélatine. Je m'étais proposé de rechercher si elle ne contenait pas d'autres principes immédiats, mais elle ne m'a donné que les réactions de la gélatine. L'emploi de l'huile a rendu très difficile la recherche de ses diverses réactions, en effet, pendant la distillation une partie de cette huile; a été saponifiée par la petite quantité de baryte libre qui existait dans le bouillon; il a pris naissance un savon de baryte insoluble, sous forme d'une poudre blanche extrêmement ténue, qui, avec la gélatine et l'huile non saponifiée a formé une émulsion blanche extrêmement solide, traversant tous les filtres et, que je n'ai jamais pu détruire. La masse spongieuse de gélatine a entraîné complètement et l'huile et le savon barytique en laissant une solution alcoolique parfaitement limpide; mais quand on redissout dans l'eau la masse précipitée; l'émulsion primitive se reforme aussitôt.

Je n'ai pas poussé plus loin l'étude de cette portion gélatineuse.

Étude du liquide D. — La solution alcoolique D est distillée au bain-marie dans le même appareil qui a servi à évaporer le bouillon primitif; en diminuant de moitié

la pression atmosphérique au moyen de la trompe on abaisse la température d'ébullition du liquide et on distille l'alcool avec une très grande rapidité. On peut distiller 4 ou 5 litres dans une heure, parce que sa chaleur spécifique de volatilisation est de beaucoup inférieure à celle de l'eau. Le premier alcool distillé est à 80° environ et peut servir pour une nouvelle précipitation ; il passe ensuite de l'alcool de plus en plus faible et enfin de l'eau. Cette solution peut aisément être réduite au dixième de son volume ; dix litres de bouillon fournissent environ un demi litre d'extrait E qu'on précipite à chaud par deux fois son volume d'alcool à 90°. Après refroidissement, le ballon contient un liquide clair F et une masse visqueuse plus lourde que lui G dont nous indiquerons plus tard le traitement.

Le liquide clair F est distillé également à pression réduite ; on recueille séparément l'alcool qui distille au début et celui qui distille à la fin de l'opération et on amène le résidu à occuper un volume de 250 centimètres cubes ; on additionne ensuite l'extrait obtenu et encore chaud de la moitié de son volume d'alcool fort et l'on abandonne le tout dans un endroit frais pendant 24 heures. Au bout de ce temps il se fait dans la masse une cristallisation assez abondante de créatine. Les cristaux sont essorés à la trompe et lavés avec quelques gouttes d'alcool étendu de son volume d'eau. 10 litres de bouillon m'ont donné environ 10 grammes de créatine sèche.

Les eaux-mères alcooliques de la créatine sont ensuite traitées par un grand excès d'alcool fort ; il se forme des

cristaux noyés dans une couche huileuse. Les cristaux sont séparés de cette couche huileuse ; ils sont constitués par de la créatine ; quant au liquide qui les baignait, il a été joint à la solution de la masse visqueuse G dont nous reparlerons plus loin.

Quant à la solution alcoolique forte H, elle est ramenée à un litre par la distillation, puis additionnée d'une solution alcoolique de chlorure de zinc contenant 10 grammes de chlorure de zinc. La solution louchit immédiatement ; mais le lendemain on y trouve un abondant précipité blanc I.

Le précipité I est séparé des eaux-mères alcooliques par filtration et repris par l'eau. Il se dissout partiellement, il reste une poudre cristalline constituée par du chlorozincate de criatinine. On le purifie aisément par cristallisation dans l'eau bouillante.

Les eaux-mères qui ont abandonné ce chlorozincate sont assez fortement acides ; or, les acides dissolvent le chlorozincate de criatinine. On fait bouillir au réfrigérant ascendant ces eaux-mères avec un léger excès d'oxyde de zinc et l'on abandonne le mélange au froid pendant 24 heures. Le lendemain on filtre et l'on a un mélange de l'excès d'oxyde de zinc et de chlorozincate de criatinine ; on l'épuise à l'eau bouillante et on en retire aisément tout le chlorozincate que l'on joint à celui qui s'était déposé le premier.

10 litres de bouillon du veau donnent entre 7 et 8 grammes de chlorozincate de criatinine.

La partie soluble dans l'eau du précipité I est consti-

tuée par des sarco-lactates de zinc. Nous aurons occasion d'en reparler plus loin.

Les eaux-mères alcooliques qui ont été traitées par l'oxyde de zinc sont distillées au bain-marie sous pression diminuée. On recueille à part l'alcool fort qui passe au début de la distillation. Ensuite on fait le vide le plus parfait que l'on peut dans l'appareil et l'on distille à sec au bain-marie. Il reste un sirop épais que l'on reprend à chaud par dix fois son volume environ d'alcool à 95°.

On attend 24 heures et après ce laps de temps il s'est fait dans le liquide un abondant précipité blanc formé de grumeaux blancs. Ce précipité J est constitué par du sarco-lactate de zinc; on le sépare des eaux-mères par filtration à la trompe. La solution aqueuse du précipité J est jointe aux eaux de lavage du précipité et concentrée au bain-marie. Quand la solution commence à devenir sirupeuse, on la traite à chaud par un volume d'alcool à 90°; le liquide abandonne du jour au lendemain des cristaux blancs agglomérés sous forme de petites sphères.

J'ai réussi, par de nombreuses cristallisations fractionnées dans l'eau, à séparer ce sel en deux autres; comme l'avait déjà fait Wislœnus. J'ai pu obtenir assez pur le lactate de zinc le moins soluble dans l'eau. La purification du lactate le plus soluble est très laborieuse, elle n'est pas encore terminée.

Le temps m'a manqué pour finir l'étude des eaux-mères du précipité J. J'ai constaté que ces eaux-mères alcooliques évaporés à sec dans le vide et reprises par l'alcool absolu abandonnaient une couche huileuse dans laquelle nagent quelques cristaux de chlorures alcalins.

Le liquide alcoolique additionné d'éther se trouble et laisse également déposer une couche huileuse, sans doute constituée par des chlorures alcalins, du lactate de potassium et peut-être des inosates autrefois décrits par Liebig. Je me propose de tenter la séparation de ces diverses substances; peut-être pourrai-je extraire de ce mélange des composés analogues aux bases des séries de la xanthine et de la créatinine que M. Gautier a retirées de l'extrait de viande de bœuf. Cette terminaison de mon travail fera l'objet d'une autre publication.

Étude du liquide B. — Revenons de quelques pas en arrière et occupons-nous du liquide B obtenu dans la distillation dans le vide du bouillon. Je rappelle que ce liquide possédait une réaction nettement alcaline et était rendu louche par une faible quantité d'une substance huileuse en suspension dans le liquide aqueux. La quantité de substance huileuse n'a pas semblé plus forte au début de la distillation qu'à la fin; aussi ai-je été obligé de traiter la masse entière du liquide distillé.

J'ai ajouté dans ce liquide de l'acide sulfurique étendu jusqu'à réaction faiblement acide, puis je l'ai abandonné pendant plusieurs jours avec un excès de carbonate de baryum. Le liquide devenu parfaitement neutre est alors filtré et évaporé au bain-marie dans de grandes capsules. L'addition d'acide sulfurique avait bien diminué l'opalescence du liquide, mais ne l'avait cependant pas complètement éclairci. De plus, pendant tout le temps de l'évaporation on percevait une odeur assez forte indiquant que l'un des produits odorants contenus dans ce liquide se

perdait dans l'atmosphère. Tout ce que je peux savoir de ce produit, c'est qu'il n'est ni alcalin ni acide.

Après complète évaporation du liquide il restait dans les capsules une petite quantité d'un sel huileux qui, au bout de quelque temps, laisse déposer des cristaux. La masse a ensuite été reprise par l'alcool étendu et bouillant, mais par refroidissement le composé s'est déposé à l'état huileux. J'ai alors redissous le tout dans l'alcool aqueux en ajoutant une quantité suffisante d'eau et j'ai abandonné le liquide dans une cloche contenant de la chaux vive et dans laquelle j'ai fait le vide. Au bout d'un temps assez long (deux ou trois mois) l'eau a été en partie absorbée par la chaux, tandis que l'alcool restait et il s'est déposé des cristaux sous forme de longues aiguilles incolores.

Ces cristaux, traités par la potasse, dégagent abondamment de l'ammoniaque, mais chauffés sur une lame de platine, ils noircissent abondamment et se charbonnent. Je les ai fait cristalliser à plusieurs reprises dans l'alcool aqueux et j'ai obtenu à chaque fois du sulfate d'ammoniaque de plus en plus pur. Ce sulfate d'ammoniaque est souillé par le sulfate d'une amine qui possède des solubilités très voisines des siennes et dont il est très difficile de le séparer.

J'ai été plus heureux en transformant ce sulfate en chlorure ; pour ce faire, je l'ai dissous dans l'eau et additionné de la quantité de chlorure de baryum correspondante ; il s'est fait un précipité de sulfate de baryum dont je me suis débarrassé par la filtration et les bases sont

passées à l'état de chlorhydrates. J'ai évaporé à sec au bain-marie le solution aqueuse et j'ai repris par l'alcool le mélange de chlorhydrates. J'ai pu, avec une dizaine de cristallisations dans ce dissolvant, obtenir du chlorhydrate d'ammoniaque parfaitement pur et volatil sans résidu charbonneux, et une quantité de chlorhydrate d'une amine, trop faible pour pouvoir être déterminée.

La solution alcoolique d'où se déposait le sulfate d'ammoniaque ne donnant plus de nouveaux cristaux, je l'ai évaporée au bain-marie et reprise par l'alcool fort. Il s'est déposé une matière huileuse extrêmement peu soluble dans l'alcool. J'ai pensé qu'elles constituaient le sulfate d'une amine et je l'ai traitée également par le chlorure de baryum en excès. La solution filtrée et évaporée à sec a été reprise par l'alcool fort qui a précipité l'excès de chlorure de baryum qui y est complètement insoluble. La solution alcoolique évaporée et reprise par l'alcool fort a fourni une nouvelle quantité de chlorure de baryum, mélangé de chlorhydrate d'ammoniaque. Enfin, la solution alcoolique évaporée à froid au-dessus de l'acide sulfurique a abandonné en petite quantité une masse confusément cristalline constituée par le mélange de plusieurs chlorhydrates. Une faible quantité de l'extrait alcoolique additionné d'une solution de potasse, acquiert aussitôt l'odeur de la triméthylamine.

La quantité de sels d'amines volatiles ainsi obtenus est extrêmement faible. 80 litres de bouillon m'ont donné environ 20 grammes de sulfates dont plus des trois quarts sont constitués par du sulfate d'ammoniaque.

Étude de la masse visqueuse G. — Je rappelle que dans le traitement du bouillon j'ai obtenu un précipité visqueux insoluble dans l'alcool à 90°, mais soluble dans l'alcool faible. J'ai réuni ensemble toutes les portions semblables obtenues dans chacune des opérations que j'ai faites afin de les traiter ensemble.

A priori, cette solution devait contenir la sarcine, la xanthine, la carnine s'il y en avait, et sans doute aussi une certaine quantité de gélatine ; elle contenait également des composés ayant les propriétés des peptones. Je me suis proposé d'extraire de ce mélange les divers alcaloïdes dont on connaissait le mode d'extraction, en introduisant le moins possible de substances étrangères.

J'ai pris le dixième de la quantité totale de matière dont je disposais et j'ai étudié un procédé d'extraction. Voici celui auquel je me suis arrêté.

La solution étant acide, j'ai alcalinisé avec une solution de baryte, puis j'ai précipité par le sous-acétate de plomb. Il s'est formé un précipité très abondant, mais très difficilement filtrable. Ce précipité est soluble dans l'acétate neutre de plomb et se dissout au moins partiellement dans l'eau bouillante. C'est à cause de sa solubilité dans l'acétate neutre de plomb que j'ai eu la précaution d'alcaliniser au préalable la solution avec de la baryte, sans cela la liqueur acide aurait transformé une partie du sous-acétate en acétate qui eût dissous partiellement le précipité. Le précipité a été filtré et lavé le mieux possible, puis mis en suspension dans l'eau et décomposé par l'hydrogène sulfuré. Mais le précipité de sulfure de plomb

qui prend alors naissance se redissout dans le liquide et l'on a une sorte de solution de sulfure de plomb colloïdal qui passe à travers tous les filtres. Tous les moyens physiques employés pour changer cet état du sulfure de plomb sont restés sans résultat ; l'addition d'acides minéraux forts n'a pas réussi davantage. Au lieu de décomposer le précipité plombique par l'hydrogène sulfuré, je l'ai traité par l'acide sulfurique ; il s'est fait un précipité blanc de sulfate de plomb que j'ai pu filtrer ; quant à l'excès d'acide sulfurique, j'ai pu m'en débarrasser en saturant la liqueur par le carbonate de baryum.

La solution ainsi obtenue a alors été traitée par l'acétate mercurique ; elle fournit un précipité abondant. En fractionnant la précipitation, j'ai pu obtenir un précipité blanc que j'ai filtré, lavé et décomposé par l'hydrogène sulfuré. J'ai pu filtrer le sulfure de mercure, j'ai concentré la solution au bain-marie et je l'ai abandonnée au-dessus de l'acide sulfurique pendant 3 mois. Je n'ai trouvé au bout de ce temps qu'une masse noirâtre analogue aux produits humiques et dont il m'a été impossible de tirer rien de pur.

Quant à la solution qui n'a pas précipité par l'acétate mercurique, je l'ai également évaporée dans le vide ; après avoir précipité le mercure, il m'est resté une masse gélatineuse rougeâtre dans laquelle j'ai constaté la présence d'une grande quantité de baryte. J'ai redissous ce composé dans une petite quantité d'eau, je l'ai additionnée d'acide nitrique étendu et chauffée quelque temps au bain-marie. La liqueur rouge s'est

parfaitement décolorée et il s'est produit assez rapidement de beaux cristaux de nitrate de baryte.

Parmi les composés connus retirés de l'extrait de viande, il n'y en a que deux qui précipitent le sous-acétate de plomb, sans précipiter l'acétate mercurique, ce sont l'inosite et la carnine. Je me suis dès le début assuré de l'absence de carnine, car la liqueur ne précipite pas l'azotate d'argent ammoniacal. Le composé que j'ai entre les mains contient donc probablement de l'inosite. Je me suis, en effet, assuré de la présence de ce composé par la réaction de Scherer. J'ai traité une faible quantité de la masse par l'acide nitrique concentré et j'ai évaporé à feu nu, j'ai ensuite repris la masse par l'ammoniaque en excès et j'ai à nouveau évaporé, enfin j'ai ajouté une goutte de chlorure de calcium et j'ai chauffé, j'ai vu se développer une belle coloration rouge.

Les eaux-mères du nitrate de baryum contiennent donc de l'inosite, je les ai additionnées d'alcool qui a produit un premier précipité d'azotate de baryum, puis, en ajoutant de l'alcool plus concentré, il s'est déposé des cristaux d'inosite.

J'ai pu obtenir à l'état de pureté cet intéressant composé; chauffé sur une lame de platine, il ne laissait pas de cendres et fondait à 217°.

Etudions maintenant les eaux-mères de la précipitation par le sous-acétate de plomb. J'ai ajouté dans les eaux mères une solution d'acétate de cuivre et j'ai porté le liquide à l'ébullition; il s'est formé un précipité d'un jaune chamois assez abondant qui contient à l'état de combi-

naison cuprique la xanthine et la sarcine. J'ai filtré ce principe, je l'ai lavé, puis je l'ai décomposé en solution aqueuse par l'hydrogène sulfuré. J'ai filtré ce sulfure de cuivre et évaporé la solution au bain-marie jusqu'à un commencement de cristallisation. A ce moment, je précipite par le nitrate d'argent en léger excès et ajoute de l'ammoniaque; il se fait un abondant précipité gélatineux légèrement coloré en jaune, je l'ai filtré, lavé et enfin traité par de l'acide nitrique de densité 1,1 à l'ébullition, comme le recommande Neubauer; la combinaison de sarcine et de nitrate d'argent cristallise par refroidissement; on la sépare du liquide, on la lave et on peut la peser après dessiccation.

Si l'on ajoute de l'ammoniaque en excès aux eaux-mères nitriques il se fait un précipité gélatineux brun qui constitue la combinaison argentique de la xanthine. Il est très important dans ces manipulations d'employer de l'acétate de cuivre exempt de fer; car l'oxyde de fer se précipite avec les bases cherchées et il est ensuite très difficile de s'en débarrasser complètement.

La quantité de sarcine trouvée dans la portion du liquide destinée aux tâtonnements nécessaires pour trouver la méthode du traitement correspondait environ à 0 gr. 25 de sarcine par kilogramme de viande de veau. Mais quand j'ai voulu faire le traitement de tout le liquide j'en ai trouvé une quantité bien inférieure. En effet, les essais ont été assez longs et pendant ce temps le reste du liquide a subi une fermentation dans laquelle presque toute la sarcine a disparu, malgré la précaution que j'avais eue de saturer le liquide de chloroforme.

La quantité de xanthine qui se trouve dans la viande de veau est extrêmement faible ; elle n'excède pas quelques centigrammes par kilogramme.

Les eaux-mères contenant les acétates de plomb et de mercure ont été alors précipitées par l'acétate de mercure. Il s'est fait un précipité très abondant, mais je me suis rendu compte que c'était le même précipité que donne le sublimé corosif dans les solutions de peptone ou de gélatine. Ce précipité, mis en suspension dans l'eau et traité par l'hydrogène sulfuré, donne du sulfure de mercure qui se redissout dans la peptone ou la gélatine en donnant une belle encre noire qui traverse tous les filtres.

Enfin les eaux-mères contenant les acétates de plomb, de cuivre et de mercure ont été débarrassées des métaux lourds par l'hydrogène sulfuré filtrées et évaporées au bain-marie. Il reste une masse poisseuse contenant abondamment de l'acétate de baryte provenant de l'acide acétique des acétates et de la baryte que j'ai ajoutée au début des opérations. En outre de ce sel il semble également y avoir dans la solution des matières analogues à la dextrine et à la peptone. Elles réduisent à froid le nitrate d'argent ammoniacal, mais elles ne réduisent la liqueur de Fehling que si on les a fait bouillir au préalable avec de l'acide sulfurique étendu. Ces matières n'ont pu être amenées à l'état de cristaux, c'est ce qui m'a décidé à abandonner leur étude.

Nous avons passé en revue successivement toutes les portions déterminées dans les bouillons par les divers ré-

actifs. Nous avons pu isoler un assez grand nombre de substances à l'état de pureté et dans quelques cas en faire des dosages approximatifs. Nous avons soumis à la même étude et aux mêmes dosage le bouillon après que le bacille de la tuberculose aviaire y a été cultivé ; les différences trouvées correspondront aux modifications apportées par cet organisme dans le milieu où il a vécu.

ÉTUDE DU BOUILLON CULTIVÉ

Le bouillon dont nous avons plus haut indiqué la préparation a étéensemencé par MM. Richet et Héricourt avec du bacille de la tuberculose aviaire. Le bacille s'est parfaitement développé dans le milieu, puis, au bout d'une quarantaine de jours il a cessé de s'accroître. Les ballons ont été alors stérilisés dans l'autoclave à 120°, ce qui n'a fait subir à leur contenu aucune modification sensible à l'œil.

Le contenu des ballons a ensuite été filtré au papier pour se débarrasser de la plus grande partie des microbes. Il est resté un bouillon bien limpide, à peine alcalin au tournesol et possédant une odeur aromatique agréable, caractéristique.

Dans le but de rechercher la nature des composés volatils qui donnent son odeur au bouillon, j'en ai soumis une certaine quantité à la distillation. Il a passé un liquide fortement odorant *parfaitement neutre* que j'ai rectifié avec un appareil à boules Lebel et Henninger. Les premières gouttes qui ont passé ont été versées en même temps qu'une faible quantité d'iode dans un ballon contenant une solution bouillante de carbonate de sodium.

J'ai perçu immédiatement et d'une manière très nette l'odeur de l'iodoforme ; il est donc permis de pen-

ser qu'il existait dans le liquide, soit de l'alcool éthylique, soit une acétone de formule générale $R-CO-CH^3$.

On aurait, en effet, dans ce cas, la réaction suivante :



Un fait m'a frappé immédiatement, je veux parler de la disparition complète des alcalis volatils existant dans le bouillon. J'ai constaté d'une manière extrêmement nette la présence dans le bouillon primitif d'une quantité très appréciable de bases volatiles ; ces composés font absolument défaut dans le bouillon cultivé. Afin d'en avoir une preuve plus évidente encore, j'ai distillé ce même bouillon après l'avoir additionné largement de potasse ; là encore le liquide distillé était parfaitement neutre. Cette remarque nous fournit des indications précieuses pour l'histoire du bacille ; il est certain que ces matières basiques, il les a employées comme matériaux pour former soit sa substance propre, soit des produits de sécrétion. Il est même naturel de penser qu'il a cessé de végéter dès que ces substances lui ont fait défaut.

Il semble alors indiqué d'étudier le rôle des sels ammoniacaux et des sels d'amines dans les cultures de tuberculose.

Après m'être rendu compte de la modification si profonde des composés volatils contenus dans le bouillon, j'ai voulu étudier celles qu'avaient subi les produits non volatils.

La première expérience que j'ai faite a été la prise

de la densité du bouillon ; cette densité a varié dans des proportions énormes. La densité du bouillon qui a été ensemencé était 1,09, celle du bouillon cultivé n'est plus que 1,05. Cette perte de densité correspond à une destruction d'environ 40 gr. par litre de matières en dissolution dans l'eau. J'ai dosé dans une expérience le poids de microbes par rapport au poids du bouillon cultivé.

1685 centimètres cubes de bouillon cultivé ont été filtrés au papier, les microbes soigneusement lavés à l'eau et exposés à l'air sur des feuilles de papier buvard J'ai obtenu ainsi 9 gr. de microbes séchés à l'air, contenant encore environ 85 0/0 d'eau, ce qui correspond à environ 1 gr. de microbe privé d'eau pour un litre de bouillon. Ce gramme de matière vivante contient à peu près 0 gr. 20 d'azote, et, nous avons vu que la quantité d'ammoniaque contenue dans le bouillon est susceptible d'être mise en liberté par la baryte est également d'à peu près 0 gr. 20 par litre de bouillon.

Le déficit en matériaux fixes semble avoir surtout porté sur la glycérine dont on avait mis dans le bouillon une quantité considérable. J'ai d'ailleurs renoncé complètement à faire de cette substance un dosage même approché. Cette substance est en effet accompagnée dans le bouillon d'une foule de substances ayant les mêmes solubilités qu'elles et qui s'y dissolvent indéfiniment.

J'ai été plus heureux pour le sucre de canne, j'ai constaté avec étonnement qu'il n'avait pas le moins du monde été employé. Le bouillon cultivé ne réduit pas

la liqueur de Fehling, il donne simplement la belle coloration rose que donnent les peptones ; mais si on l'intervertit, il réduit alors abondamment.

Ainsi donc, non seulement le bacille n'a pas brûlé le sucre, mais il ne l'a même pas interverti.

J'ai interverti une petite quantité de bouillon cultivé et j'y ai dosé le sucre, j'en ai trouvé 20 gr. par litre, j'ai répété la même opération sur le bouillon normal pour me rendre compte si les nombreuses matières existant dans le bouillon ne troubleraient pas le dosage et j'ai trouvé cette même quantité, celle qu'on y avait mise. Je me suis trouvé dans ces dosages aux prises avec une petite difficulté. D'abord les solutions étaient trop fortes, je les ai diluées de 5 fois leur volume d'eau ; dans ces conditions, le dosage se faisait dans d'assez bonnes conditions sauf qu'à la fin de l'opération il se produisait dans le liquide une sorte de précipité blanc jaunâtre qui ne se rassemble pas et qui rend un peu indistinct le moment précis de la réduction complète.

J'ai pu éviter complètement cet inconvénient en employant un procédé indiqué par M. Causse et qui consiste à ajouter à la liqueur de Fehling un large excès de ferrocyanure de potassium. La liqueur ne cesse pas d'être bleue, mais la réduction, au lieu d'y faire naître un précipité, la décolore ; j'ai pu apprécier très nettement la fin de l'opération.

M. Hammerschlag, qui a fait des expériences analogues sur la tuberculose humaine, a constaté également que le sucre était à peine attaqué (*Centralblatt für Klinischen Me-*

decin, 1891, n° 1, p. 9). Il a trouvé que la quantité de sucre, qui était détruite par le bacille, était toujours comprise entre 0 et 1/10 de la quantité totale, et que d'autre part cette quantité de sucre ne dépassait pas le quart du poids du bacille qui a pris naissance dans le bouillon. Malgré cela, M. Hammerschlag considère le sucre, de même que la dextrine et d'autres hydrates de carbone, comme des substances nutritives pour le bacille.

Une des substances les plus abondantes, consistant dans le bouillon normal, était la gélatine, à telles enseignes qu'il se prenait en gelée par le refroidissement. La gélatine n'existe plus dans le bouillon cultivé qu'à l'état de traces. En effet, nous verrons plus loin que le bouillon concentré au dixième ne précipite que difficilement et fort peu l'alcool à 60°, dans lequel la gélatine est insoluble. Cette gélatine a sans doute été peptonisée, la quantité de peptone existant dans le bouillon cultivé est en effet considérable.

Enfin, je n'ai pu retrouver de créatinine dans le bouillon cultivé, l'extrait alcoolique par l'alcool absolu abandonne une petite quantité de matières solubles dans l'éther. Cette solution ne précipite pas par addition de chlorure de zinc en solution alcoolique, ce qui permet de conclure à l'absence de la créatinine.

Il en est autrement de la sarcine, le bouillon concentré précipite encore abondamment par l'acétate de cuivre. J'ai fait dans ce précipité le dosage de la sarcine et de la xanthine.

J'ai traité ce précipité bien lavé et en suspension dans

l'eau par un courant d'hydrogène sulfuré, j'ai filtré pour enlever le sulfure de cuivre et j'ai concentré la solution au bain-marie pour chasser l'excès d'hydrogène sulfuré. La sarcine cristallise par refroidissement. J'ai précipité la solution par l'azotate d'argent et l'ammoniaque, j'ai eu un précipité blanc que j'ai filtré et lavé.

Ce précipité est dissous dans l'acide nitrique de densité 1,1 puis porté à l'ébullition ; le nitrate de sarcine, argentique cristallise par refroidissement. J'ai filtré, séché et lavé, pesé ce précipité.

J'ai pris 250 cmc. de bouillon cultivé, j'ai obtenu un précipité argentique pesant 0 gr. 1140, correspondant à 0 gr. 064 de sarcine. Le bouillon cultivé contient donc encore 0 gr. 2560 de sarcine par litre.

Quant à la liqueur argentique, elle ne donnait, avec l'ammoniaque, qu'un précipité presque impondérable, la xanthine a donc été à peu près complètement détruite.

J'ai fait d'ailleurs les mêmes dosages dans le bouillon non cultivé. J'ai obtenu, pour 250 cmc. de bouillon, 0 gr. 3 de sarcine argentique correspondant à 0 gr. 5332 par litre de bouillon ; j'ai eu en même temps 0 gr. 0414 de xanthine argentique, correspondant à 0 gr. 0065 de xanthine par litre.

Après m'être rendu compte de ce qu'étaient devenues les matières dont je connaissais l'existence dans le bouillon, j'ai voulu rechercher celles qui pouvaient y avoir été élaborées par le bacille ; c'est pourquoi j'ai soumis ce bouillon cultivé à des précipitations fractionnées et méthodiques par l'alcool et l'éther aux différentes concen-

trations, me réservant d'étudier spécialement chacune des fractions ainsi obtenues. Afin de ne pas être troublé dans ces opérations par les sulfates et phosphates de potasse qui sont très peu solubles dans l'alcool faible, je me suis proposé de les transformer en chlorures par l'addition de chlorure de baryum. Afin de ne pas ajouter un excès de ce sel qui m'aurait gêné autant que ceux que je voulais enlever, j'ai fait au préalable un dosage approximatif pour me rendre compte de la quantité qu'il en fallait mettre. J'ai eu un abondant précipité blanc que j'ai laissé quelques heures au contact de la liqueur chauffée au bain-marie, puis j'ai filtré au papier. J'ai obtenu une solution parfaitement limpide que j'ai évaporée au bain-marie dans une capsule tant qu'elle veut perdre de l'eau. Dans ces conditions, la solution se concentre au dixième de son volume.

M. Koch a publié récemment ses études sur le bouillon de culture de la tuberculose humaine (*Deutsche und Wochenschrift*, 1890, n° 46, et 1891, n° 17). Il employait des bouillons de culture en tout semblable à celui dont nous nous sommes servi. Le bouillon, une fois cultivé, était stérilisé, filtré et évaporé au bain-marie. C'est cet extrait qui constituait la tuberculine ou lymphé de Koch. Dans le but d'obtenir un composé plus actif et plus pur que cette tuberculine qui est un mélange d'une complexité effroyable, il l'a soumise à l'action de l'alcool de manière à ce que le liquide total fût à 60° centésimaux. Cet alcool dissout la plus grande partie du produit, il s'y produit un précipité qui, lavé à refus par l'al-

cool à 60°, puis avec de l'alcool absolu, a été séché dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique. Le produit final constitue une poudre blanche dont la quantité est environ le centième de celui de la tuberculine ; ce composé, que M. Koch désigne sous le nom de tuberculine purifiée, possède des propriétés physiologiques extrêmement intéressantes, pour la description desquelles je renvoie le lecteur au mémoire original. Quant aux propriétés chimiques, qui m'intéressent plus particulièrement, elles montrèrent que le composé en question était loin d'être pur.

Cette tuberculine se comporte comme une sorte de matière albuminoïde jouissant de propriétés extrêmement singulières. L'eau, et surtout l'eau chaude la dissolvent, puis la dissolution se coagule en partie ; la glycérine la dissout aisément et sa solution peut se conserver indéfiniment, même portée à une haute température. Enfin, la matière à l'état sec contient environ 20 % de cendres constituées principalement par du phosphate de potassium.

C'est la présence de ce phosphate de potassium qui m'a poussé à employer le chlorure de baryum ; j'espère obtenir ainsi une matière moins riche en cendres.

J'ai répété la première expérience de M. Koch, avec cette seule différence de l'emploi du chlorure de baryum, afin de savoir si le bacille de la tuberculose aviaire sécrétait un produit identique ou analogue à la si active tuberculine.

J'ai donc précipité par l'alcool le bouillon concentré

au dixième de son volume ; je calculais le volume de l'alcool à ajouter et son titre de manière à ce que l'alcool final fût à 60 % de concentration et que le volume final de la solution alcoolique fût de 800 centimètres cubes pour 200 cmc. de tuberculine correspondant à deux litres de bouillon de culture.

En faisant cette opération dans une éprouvette à fond plat, le précipité se dépose parfaitement et l'on décante aisément la liqueur claire alcoolique qui le surnage. On lave une dizaine de fois ce précipité et chaque fois avec une centaine de centimètres cubes d'alcool à 60° ; enfin quand l'alcool de lavage est devenu tout à fait incolore, on le remplace par de l'alcool de plus en plus fort et enfin par de l'alcool à 95°. On lave deux ou trois fois à l'alcool à 95° toujours par décantation et l'on fait tomber la bouillie obtenue dans une capsule que l'on met dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique. Au bout de quelques jours l'alcool est complètement absorbé et il reste dans la capsule une masse légère extrêmement dure et se cassant seulement au pilon.

Ce composé se redissout très lentement dans l'eau ; il est constitué surtout par de la gélatine qui n'a pas été transformée par le bacille. La solution contient une matière albuminoïde qui se coagule par la chaleur ou l'action des acides minéraux forts.

Avant de préparer cette tuberculine purifiée par le chlorure de baryum, j'ai préparé un échantillon en tendant textuellement les indications de Koch.

J'ai fait dans la matière sèche un dosage de cendres.

J'ai pris 0g. 082 de matière que j'ai calcinée dans un creuset ouvert jusqu'à disparition complète du charbon, il restait 0m. 02 de cendres, ce qui revient à une teneur de 24,38 % de cendres. J'ai constaté d'ailleurs que ces cendres étaient constituées principalement par des phosphates. En effet la solution aqueuse traitée par le nitrate d'argent donne un précipité jaune entièrement soluble dans l'acide nitrique, ce qui démontre l'absence de chlorures. Ce précipité jaune, abandonné à lui-même se réduit partiellement, réaction due à certains composés oxydables qui n'ont pu encore être déterminés.

La solution aqueuse de cette tuberculine n'est pas stable, elle abandonne un coagulum quand on la chauffe, mais la solution dans l'a glycérine à 50 % est beaucoup plus stable et peut être chauffée longtemps à 100° sans être modifiée; cette propriété lui est commune avec la tuberculine purifiée de Koch.

Cette tuberculine a été étudiée au point de vue physiologique par M. le professeur Richet. Il a constaté qu'elle était à peu près sans action sur les lapins non tuberculeux, mais qu'elle tuait assez rapidement les lapins tuberculeux.

Il est difficile de comparer son énergie avec celle de la fameuse tuberculine du savant allemand; car M. Koch opérait sur des cobayes avec de la tuberculine humaine, tandis qu'il s'agit ici de la tuberculine aviaire sur des lapins.

Les eaux-mères alcooliques ont été réunies aux alcools de lavage du précipité obtenu par l'alcool à 60°, le tout

est distillé pour retrouver l'alcool, puis évaporé au bain-marie à refus. Il reste une masse visqueuse, brune à laquelle j'ajoute assez d'alcool fort pour que la masse contienne 75 % d'alcool, il se fait un nouveau précipité très abondant cette fois, mais qui au lieu d'être solide et blanc, est brun et visqueux. Ce précipité lavé à l'alcool à 95° se colore à peine, je l'ai redissous dans l'eau et j'ai constaté qu'il contenait une très forte quantité de peptones.

Les eaux-mères alcooliques de ce précipité ont été traitées comme les précédentes, mais l'extrait correspondant a été traité par l'alcool à 90°. Il se dépose encore un précipité huileux insoluble dans l'alcool à cette concentration, qui a été lavé, séparé et redissous dans une petite quantité d'eau. J'ai constaté que cette portion insoluble dans l'alcool à 90° possédait des propriétés voisines de celles de la portion insoluble dans l'alcool à 75°, elle contient également une forte teneur en peptones. Ces deux solutions aqueuses précipitent l'une et l'autre le chlorure mercurique et réduisent à froid le nitrate d'argent ammoniacal. Le précipité mercurique décomposé par l'hydrogène sulfuré donne une solution d'un brun noir d'où il est absolument impossible de séparer le sulfure de mercure.

Enfin la solution dans l'alcool fort est évaporée à moitié et décomposée par la moitié de son volume d'éther ; il se produit immédiatement deux couches ; la supérieure éthéro-alcoolique, l'inférieure contenant de l'eau, de la glycérine et des sels. En effet la glycérine est fort peu so-

luble dans l'éther, surtout si celui-ci est quelque peu humide.

La couche de glycérine est séparée, concentrée au bain-marie et redissoute dans l'eau, la solution éthéro-alcoolique est distillée et traitée à nouveau par un peu d'alcool et beaucoup d'éther ; il se dépose une seconde fois de la glycérine que l'on sépare et la solution éthérée est traitée de même. Il reste à la fois une solution éthérée contenant une petite quantité de matières en solution et entre autres une petite quantité d'un composé très odorant, insoluble dans l'eau et qui semble être un acide gras.

Nous avons donc en définitive séparé notre bouillon en 5 portions:

1° Précipité insoluble dans alcool à 60°

2° — — — — 75°

3° — — — — 90°

4° Précipité insoluble dans l'alcool éthéré

5° Partie soluble dans l'alcool éthéré.

Chacune de ces portions sera soumise à l'analyse physiologique, mais cette partie de ce travail n'est pas encore achevée.

La portion (5) semble être très faiblement toxique pour les animaux tuberculeux, elle est d'ailleurs inoffensive pour les animaux sains. C'est dans cette partie que j'ai recherché la créatinine, car c'est là qu'elle se trouverait s'il y en avait vu sa très grande solubilité dans l'alcool et dans l'éther, je n'en ai pas trouvé trace.

ETUDE DES CORPS DES BACILLES

M. Hammerschlag dont j'ai déjà cité le nom à propos du dosage dans le bouillon de culture de la tuberculose humaine, a fait des bacilles une étude chimique très intéressante.

Il a soigneusement séparé les bacilles du bouillon, les a lavés, d'abord à l'eau, puis à l'acide acétique ; il a fait ensuite un dosage d'eau. Il a trouvé que dans ces cas le bacille humide perdait 88,7 0/0 de son poids par la dessiccation, dans un autre cas 83,1 0/0.

Le bacille desséché a été ensuite repris par un mélange d'alcool et d'éther, ce dissolvant a enlevé dans un cas 28,2 0/0, dans l'autre 26,2 0/0 de la quantité totale. L'auteur a constaté que ce produit soluble était constitué par des graisses, un peu de lécithine, mais sans chlolesterine. Il a fait enfin l'analyse élémentaire de la partie insoluble dans l'alcool. Il a trouvé :

$$C = 51,62$$

$$H = 8,07$$

$$Az = 9,09$$

$$\text{Cendres} = 8$$

Cette analyse montre, par sa faiblesse en azote que ce produit est un mélange d'une matière albuminoïde et d'une matière non azotée, qui est la cellulose,

En effet en reprenant la masse insoluble dans l'alcool éthéré par la potasse à 10/0, on a pu dissoudre une matière albuminoïde donnant toutes les réactions habituelles, (acide xanthoprotéique, réactif de Millon, réactif de Tauret). Il reste un résidu qui constitue la cellulose, en effet, il se dissout dans l'acide sulfurique concentré en donnant une solution qui réduit la liqueur de Fehling.

M. Hammerschlag attachait un grand intérêt à l'extraction de la lécithine qui n'existe pas dans les autres bacilles. A côté de la lécithine et de la graisse, se trouvent dans l'extract alcool-éthéré une matière toxique que l'on peut en extraire au moyen de l'eau. Ce poison agit à faible dose sur les animaux et les tue assez rapidement.

J'ai effectué sur le bacille de la tuberculose aviaire des recherches analogues, quoique moins complètes. J'ai constaté que le bacille, chauffé pendant 2 à 3 jours à 50° avec une solution de soude à 10 0/0 se dissout presque entièrement. La liqueur a été ensuite filtrée au filtre Chamberland elle avait pris une forte odeur de méthylamine qui est probablement due à la décomposition de la névrine de la lécithine.

La liqueur filtrée, additionnée de quelques gouttes d'un sel cuivrique prend une magnifique coloration d'un rose violacé.

Enfin la solution alcaline acidifiée par l'acide sulfurique donne un précipité floconneux qui se dissout partiellement dans l'éther mais qui se dissout entièrement dans la potasse. Ce précipité est un mélange d'un acide gras et d'une matière albuminoïde.

En somme, on voit que le bacille de la tuberculose aviaire semble, par sa composition chimique, tout à fait analogue à celui de la tuberculose humaine ; les dédoublements qu'il accomplit dans le bouillon sont également de même ordre, mais les composés qu'il produit sont infiniment moins toxiques.

Afin d'extraire du corps même du bacille la toxine que j'y supposai contenue, je m'y suis pris d'une manière différente de celle indiquée par M. Hammerschlag. J'ai traité par la soude à 10 0/0. je l'ai presque neutralisée par l'acide sulfurique et j'ai terminé la neutralisation par l'acide carbonique, puis j'ai abandonné le tout dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique. Il s'est fait, au bout d'un certain temps une abondante cristallisation de sulfate de soude, les eaux-mères quand, on le juge assez concentrées, peuvent être avantageusement employées pour l'étude physiologique de la toxine. Le sulfate et le bicarbonate de soude qui se forment avec cette dernière étant sans action sur l'organisme à faible dose. L'étude physiologique n'a pas encore été faite.

CONCLUSIONS

La comparaison des analyses du bouillon avant et après la culture, m'a montré que, quand cette dernière se faisait dans de bonnes conditions, la destruction des matériaux fixes atteignait presque la moitié du résidu fixe total.

Comme aliment non azoté le bacille consomme presque exclusivement de la glycérine et est presque sans action sur le sucre de canne. Pour ce qui est des aliments azotés, on peut conclure des dosages que j'ai faits que les divers produits sont d'autant plus facilement assimilés par lui qu'ils sont plus simples et que l'ammoniaque ou une amine peut en être plus facilement dégagée.

J'ai démontré qu'il existait dans le bouillon normal de l'ammoniaque en quantité assez faible 0 gr. 3 par litre environ. Cette ammoniaque est ou simplement à l'état de sel ou à l'état de combinaison avec la matière organique, mais combinaison assez instable pour qu'une solution étendue de baryte et la température de 50° puissent la mettre en liberté. Or, cette ammoniaque a disparu après la culture. La créatine et la créatinine sont susceptibles de fournir de l'ammoniaque sous des actions hydratantes assez faibles, je n'ai pu en retrouver dans le bouillon cultivé.

Au contraire les substances azotées dans lesquelles l'azote est lié assez solidement au reste de la molécule pour ne former de l'ammoniaque qu'en présence d'actions hydratantes énergiques ne sont attaquées que lentement et incomplètement par le bacille. C'est le cas de la sarcine, et des diverses matières albuminoïdes qui se trouvaient dans le bouillon primitif (gélatine et peptone).

J'ai toujours désiré trouver pour ce bacille un terrain de culture artificiel, exempt de matières albuminoïdes, afin de pouvoir en extraire aisément les toxalbumines que le microbe y a élaborées. Je crois maintenant être assez armé pour pouvoir faire des tentatives de ce genre avec quelques chances de réussite.

J'ai préparé une série de bouillons artificiels exempts de matières albuminoïdes et les essais de culture se font actuellement. Les résultats de ces recherches feront l'objet d'une prochaine publication.

VU :

Le Président de la thèse,
A. GAUTIER.

VU :

Le doyen,
BROUARDEL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le vice-recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

